



12 **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: **93111153.8**

51 Int. Cl.⁶: **C12N 1/20, A23B 4/22, A23L 1/314, //(C12N1/20, C12R1:225)**

22 Anmeldetag: **13.07.93**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
08.03.95 Patentblatt 95/10

71 Anmelder: **Karl Müller & Co. KG**
Klagenfurter Strasse 1-3
D-70469 Stuttgart (DE)

64 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

72 Erfinder: **Hammes, Walter Prof.Dr.**
Talstr. 60/I
70794 Filderstadt (DE)

74 Vertreter: **Thiel, Christian et al**
Patentanwälte
Herrmann-Trentepohl, Kirschner, Grosse,
Bockhorni,
Schaeferstrasse 18
D-44623 Herne (DE)

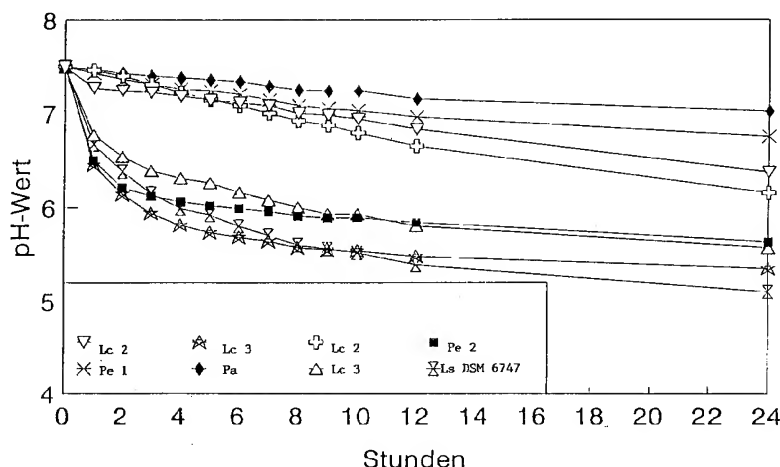
54 Zum Reifen von Rohwurst geeignete Mikroorganismen vom Stamm *Lactobacillus sake*.

57 Ein neuer Mikroorganismus vom Stamm *Lactobacillus sake* DSM 6747 ist insbesondere zur Reifung von Wurstwaren geeignet. Er führt zu einer Verbes-

serung des Säuerungsverhaltens, zu einer Beschleunigung des Reifungsprozesses sowie zu einer stabilen und intensiven Farbgebung.

Fig. 4

Pe: *Pediococcus pentosaceus*
 Pa: *Pediococcus acidilactici*
 Lc: *Lactobacillus curvatus*
 Ls: *Lactobacillus sake*



Die Erfindung betrifft einen neuen Mikroorganismus der Art *Lactobacillus sake*, der insbesondere zur Reifung von Fleischwaren geeignet ist. Der neue Mikroorganismus wurde bei der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen nach den Bestimmungen des Budapester Vertrags hinterlegt und wird dort unter der Eingangsnummer DSM 6747 geführt.

Es ist seit geraumer Zeit bekannt, daß zur Fermentierung von rohen Pökelfleischwaren (Absäuerung) Milchsäurebildner als Starterkulturen eingesetzt werden. Diese konventionellen Säurebildner entstammen in der Regel fremden Biotopen und sind im allgemeinen auf ihre Leistungsfähigkeit und ihre Darstellungsmöglichkeit hin selektiert.

DE-C1-37 39 989 beschreibt den Mikroorganismus vom Stamm *Lactobacillus curvatus* DSM 4265, die zur Herstellung von Pökelfleischwaren geeignet sind. Dieser Mikroorganismus wird in einer Menge von 5×10^9 Keimen pro kg Wurstmasse in gefriergetrocknetem Zustand zugesetzt. Die Reifung unter kontrollierten Klimabedingungen dauert etwa 10 Tage und führt zu einer Absenkung des pH-Werts, zur Ausbildung eines typischen Aromas sowie zu einer Stabilisierung der Rohwurst durch Behinderung der spontanen Säurebildnerflora.

Insgesamt hat sich jedoch gezeigt, daß der Reifungsprozeß mit herkömmlichen *Lactobacillen* trotz relativ hoher Reifungstemperaturen von bis zu 25°C relativ langwierig ist.

Dieser lange Reifungsprozeß begünstigt die Ausbildung einer konkurrierenden Spontanflora, was nicht nur unter hygienischen Gesichtspunkten unerwünscht ist, sondern auch unter dem Gesichtspunkt der Kontrollierbarkeit des Reifungsprozesses.

Weiterhin werden zur Stabilisierung von Fleischwaren Mikroorganismen vom Stamme *Pediococcus pentosaceus* eingesetzt, die ebenfalls zur Ausbildung von Milchsäure und zur Absenkung des pH-Werts führen. Die Verwendung dieser Mikroorganismen ist beispielsweise in der bereits oben erwähnten DE-C1-37 39 989, Beispiel 3, beschrieben. Dieser Mikroorganismus führt jedoch zu einer nicht für alle Produkte als optimal zu bezeichnenden unzureichenden Rötung des Produkts, sofern nicht geeignete Maßnahmen getroffen werden. Als solche Maßnahme gilt die Zugabe von Hefe, beispielsweise der Art *Debariomyces hansenii*, die innerhalb der Fermentierungszeit von 24 bis 36 Stunden bis hin zu einem End-pH-Wert der fertigen Wurst von 5,4 bis 5,2 zu einer ausreichenden Umrötung der Wurstmasse führt. Der Zusatz dieses Hefestamms führt dabei aber zu einem typischen Eigengeschmack der Wurst. Auch die Umrötung ist hinsichtlich ihrer Beständigkeit nicht immer optimal.

Die bekannten Mikroorganismen, die zur Reifung von Rohwurst eingesetzt werden, benötigen für eine maximale Aktivität eine recht hohe Tempe-

ratur und einen nicht zu stark abgesenkten pH-Wert. Weiterhin wird ihre Aktivität durch eine zu hohe Kochsalzkonzentration eingeschränkt.

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Mikroorganismus, der bei ausreichender Kochsalztoleranz und Beständigkeit gegen niedrige pH-Werte auch bei unterhalb der bisherigen Reifungstemperaturen von Wurstwaren liegenden Temperaturen eine ausreichende Reifungsgeschwindigkeit gewährleistet. Darüber hinaus ist eine durchgehende Umrötung der behandelten Rohwurst wünschenswert wie auch eine stabile Pökelfarbe über die Haltbarkeitsdauer der Wurstware.

Dieses Ziel wird mit einem Mikroorganismus der eingangs genannten Art erreicht, der insbesondere für die Reifung von schnittfester Rohwurst geeignet ist, aber auch für die Erzeugung streichfähiger Rohwurst.

Die Erfindung betrifft ferner ein Mittel zum Reifen von Rohwurst, das wenigstens einen Mikroorganismus vom Stamm *Lactobacillus sake* DSM 6747 enthält. Zweckmäßigerweise können diesem Mittel weitere Mikroorganismen zugesetzt sein, insbesondere ein Stamm von *Staphylococcus carnosus*, wie er üblicherweise bei der Wurstherstellung verwandt wird. Mit einem solchen weiteren Stamm wird eine optimale Umrötung des Produkts erreicht.

Zweckmäßigerweise enthält das Mittel die Stämme *Lactobacillus sake* DSM 6747 und *Staphylococcus carnosus* in einem Verhältnis, bezogen auf die Keimzahl von 20:80 bis 80:20, vorzugsweise etwa 50:50. Es ist ferner zweckmäßig, daß das Reifungsmittel die Mikroorganismen in gefriergetrocknetem Zustand, gegebenenfalls neben üblichen weiteren Bestandteilen, enthält. Übliche weitere Bestandteile sind beispielsweise Nährstoffe und -salze.

Das erfindungsgemäße Mittel wird in einer Menge von 20 bis 100 g pro 100 kg Wurstmasse eingesetzt, vorzugsweise etwa 50 g pro 100 kg. Dies entspricht einer Menge von 10^8 bis 10^{11} Keimen/kg Wurstmasse, insbesondere etwa 10^9 bis 10^{10} Keimen. Besonders bevorzugt ist eine Menge von etwa 5×10^9 Keimen des Stammes *Lactobacillus sake* DSM 6747 und etwa 5×10^9 Keimen der Spezies *Staphylococcus carnosus* pro kg Wurstmasse.

Der neuentwickelte Stamm von *Lactobacillus sake* zeigt optimale Fermentationseigenschaften, auch unter bei der Wurstherstellung extremen Bedingungen. Eine gute Katalaseaktivität führt zu einer Farb- und Aromastabilisierung beim Produkt. Der Stamm hat ferner den Vorteil, daß er über eine Plasmiduntersuchung schnell und leicht untersucht bzw. nachgewiesen werden kann.

Das erfindungsgemäße Reifungsmittel führt ferner bei einer beschleunigten Säuerung der damit behandelten Rohwurst zu einer kontrollierten und

standardisierten Fermentation. Durch eine Behinderung der spontanen Mikroorganismenflora wird das hygienische Risiko vermindert und die Ausbildung eines für den erfindungsgemäßen Mikroorganismus charakteristischen Fermentationsaromas erzielt. Die bei der Fermentation ausgebildete typische Pöckelfarbe erweist sich über die Haltbarkeitsdauer der Wurst als überdurchschnittlich stabil.

Von den beigefügten Abbildungen zeigt

- Fig. 1 A bis E das Wachstumsverhalten verschiedener Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Temperatur, wobei Fig. 1 C die Daten für *Lactobacillus sake* DSM 6747 angibt;
- Fig. 2 A bis H den Einfluß des pH-Wertes auf die Wachstumsgeschwindigkeit verschiedener Mikroorganismen, wobei die Werte für *Lactobacillus sake* DSM 6747 in Fig. 2 C dargestellt sind;
- Fig. 3 A bis H den Einfluß der NaCl-Konzentration auf die Wachstumsgeschwindigkeit verschiedener Mikroorganismen, darunter *Lactobacillus sake* DSM 6747 in Fig. 3 G sowie
- Fig. 4 die Säuerungsgeschwindigkeit verschiedener Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Zeit.

Der in Fig. 1 dargestellte Einfluß der Temperatur auf die Wachstums- und Säuerungsgeschwindigkeit verschiedener Mikroorganismen gegen einen externen Standard zeigt für den erfindungsgemäßen *Lactobacillus sake* DSM 6747 einen kontinuierlichen Anstieg von 5° bis 35° C. Gegenüber anderen zur Vermentierung von Rohwurst verwandten Mikroorganismen hat der erfindungsgemäße Mikroorganismus die bei der üblichen Fermentierungstemperatur von 25° C absolut höchste Wachstumsgeschwindigkeit. Die kontinuierliche Abnahme der Werte bis zu einer Temperatur von 5° C erlaubt eine einfache Steuerung der Fermentierung bei der jeweilig erwünschten Temperatur, wobei die vergleichsweise relativ hohen Geschwindigkeiten jeweils eine relativ kurze Reifungszeit ermöglichen. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist selbst bei 5° C der aller anderen untersuchten Mikroorganismen überlegen.

Wie sich aus Fig. 2 ergibt, ist die relative Wachstumsgeschwindigkeit des erfindungsgemäßen Mikroorganismus bis hinunter zu einem pH-Wert von 5 im wesentlichen pH-unabhängig. Lediglich *Pediococcus pentosaceus* PEB zeigt eine vergleichbar günstige Wachstumsgeschwindigkeit bei niedrigen pH-Werten.

Fig. 3 zeigt die relative Wachstumsgeschwindigkeit des erfindungsgemäßen Mikroorganismus in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration im Vergleich zu einer Reihe herkömmlicher, bei der Fermentierung von Rohwurst verwandter Mikroorganismen. Die überlegene Wachstumsgeschwindigkeit des erfindungsgemäßen Stamms von *Lactobacillus sake* bei niedrigen NaCl-Konzentrationen bis zu 4 % ist deutlich zu erkennen. Die Kochsalztoleranz ist eine Eigenschaft, die insbesondere für die Herstellung stärker gesalzener Wurstwaren von Bedeutung ist, denen Kochsalz in Mengen von bis zu 6 Gew.-% zugesetzt werden darf.

Fig. 4 zeigt das Reaktivierungsverhalten von Starterkulturmischungen einer Reihe herkömmlicher Mikroorganismen im Vergleich zu dem erfindungsgemäßen *Lactobacillus sake* DSM 6747. Dazu wird die Säuerungsgeschwindigkeit nach Einrühren von 50 g Starterkulturmischung und 500 ml Wasser mit einem herkömmlichen Nährmedium bei einer Inkubationstemperatur von 4° C in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Lediglich ein Stamm von *Lactobacillus curvatus* LC3 zeigt ein ähnlich gutes Reaktivierungsverhalten mit einem starken Abfall des pH-Werts in den ersten 10 Stunden; insgesamt werden mit dem erfindungsgemäßen Mikroorganismus über die Meßdauer von 24 Stunden die niedrigsten pH-Werte erhalten, was das günstige Säuerungsverhalten dieses Mikroorganismus unterstreicht.

Die Erfindung wird durch das folgende Ausführungsbeispiel näher erläutert.

Beispiel

Lactobacillus sake DSM 6747 bei der Herstellung von Salami (schnittfeste Rohwurst)

Materialzusammenstellung

30 kg Rindfleisch, grob entseht, sichtbarer Fettanteil 5 %,
 30 kg Schweinefleisch, sehnenfrei, sichtbarer Fettanteil 5 %,
 20 kg Schweinebauch, sichtbarer Fettanteil 60 %, 20 kg Rückenspeck, ohne Schwarte

Zusätze je 1 kg Material

28,0 g Kochsalz
 0,3 g Kaliumnitrat
 4,0 g Glukose
 2,0 g Pfeffer, weiß, gemahlen
 5 x 10⁹ *Lactobacillus sake* DSM 6747, gefriergetrocknet
 5 x 10⁹ *Staphylococcus carnosus*, gefriergetrocknet (zur Optimierung der Umrötung, handelsübliche Qualität)

Zur Herstellung der Rohwurstmasse wurden die Materialien jeweils in Stücke geschnitten, das Rindfleisch, der Schweinebauch und der Speck hartgefroren und das Schweinefleisch gut durchgekühlt und unmittelbar vor der Verarbeitung in üblicher Weise gewolft.

Die gefriergetrockneten Starterkulturen *Lactobacillus sake* DSM 6747 und *Staphylococcus carnosus* wurden in 500 ml Wasser mit einer üblichen Reaktivierungsmischung ein-gerührt.

Das Rindfleisch wurde bei Zugabe der Starterkulturen im Kutter so lange vorzerkleinert, bis die Masse etwas bindet. Danach wurden das Kaliumnitrat, die Glukose sowie der Pfeffer hinzugefügt und die Masse noch eine kurze Zeit im Kutter weiter laufengelassen, um eine ausreichende Vermischung zu erzielen. Danach wurden der Speck und der Schweinebauch zugesetzt. Es wurde so lange weitergekutert, bis der Speck eine Körnung von 6 - 8 mm aufwies. Anschließend wurde das vorgewolfte Schweinefleisch mit dem Kochsalz eingekutert und die Gesamtmasse so lange weitergekutert, bis das Fett die übliche Körnung von etwa 2 mm und die Wurstmasse Bindung aufwies.

Die fertige Wurstmasse mit einer Temperatur von -2 °C wurde in wasserdurchlässige Hautfaserdärme vom Kaliber 70 mm eingefüllt. Anschließend wurden die gefüllten Därme zur Reifung in die Klimakammer verbracht.

Zunächst wurden die Würste bei 70 % relativer Luftfeuchtigkeit und etwa 18 °C Temperatur 6 Stunden vorkonditioniert, um das äußere Schweißwasser wegzutrocknen. Danach wurde zur weiteren Konditionierung die relative Luftfeuchtigkeit 18 Stunden auf 94 % erhöht. Die eigentliche Reifung erfolgte bei einer Anfangstemperatur von 24 °C über einen Zeitraum von 36 bis 48 Stunden, wobei die Temperatur und Luftfeuchtigkeit langsam auf übliche Bedingungen zurückgenommen und die Würste fertig-geraucht wurden.

Nach der Trocknung und der üblichen Nachreifbedingungen wurde ein pH-Wert von 5,2 bis 5,0 festgestellt. Die Würste wiesen eine hervorragende Umrötung sowie eine sehr haltbare und ansprechende Pökelfarbe im Anschnitt auf.

Patentansprüche

1. *Lactobacillus sake* DSM 6747, insbesondere zum Reifen von Fleischwaren.
2. Mittel zum Reifen von Rohwurst, dadurch gekennzeichnet, daß es Mikroorganismen vom Stamm *Lactobacillus sake* DSM 6747 enthält.
3. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es den Mikroorganismus *Lactobacillus sake* DSM 6747 zusammen mit wenigstens

einem weiteren Mikroorganismus enthält.

4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es als weiteren Mikroorganismus einen Stamm von *Staphylococcus carnosus* enthält.
5. Mittel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es Mikroorganismen der Stämme *Lactobacillus sake* DSM 6747 und *Staphylococcus carnosus* im Verhältnis 20:80 bis 80:20 enthält.
6. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis etwa 50:50 ist.
7. Mittel nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es die Mikroorganismen in gefriergetrocknetem Zustand enthält.
8. Verwendung von *Lactobacillus sake* DSM 6747 zum Reifen von Rohwurst.
9. Verwendung nach Anspruch 8 in einer Menge von 10^8 bis 10^{11} Keimen/kg Rohwurstmasse.
10. Verwendung nach Anspruch 9 in einer Menge von 10^9 bis 10^{10} Keimen/kg Rohwurstmasse.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 10 in einer Menge von 5×10^9 Keimen des Stammes *Lactobacillus sake* DSM 6747 zusammen mit etwa 5×10^9 Keimen eines Stammes von *Staphylococcus carnosus*.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 11 zusammen mit bei der Reifung von Wurstwaren üblichen Würz-, Aroma- und Zusatzstoffen.

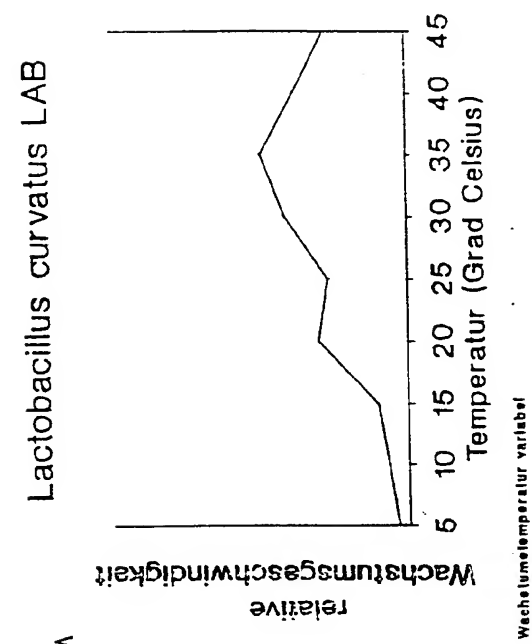
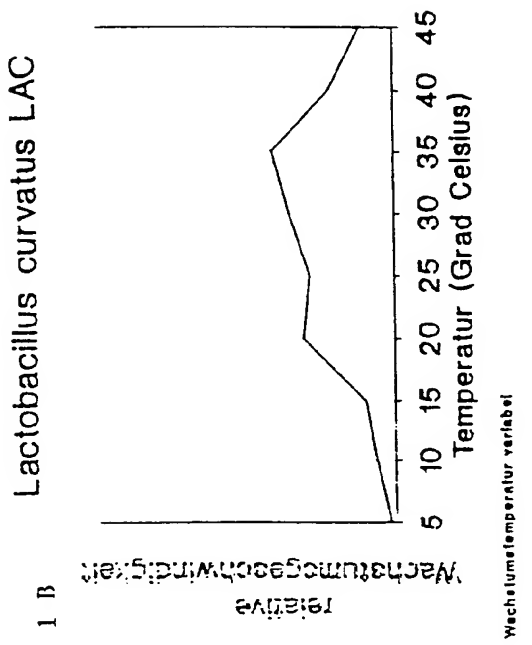


Fig. 1 A

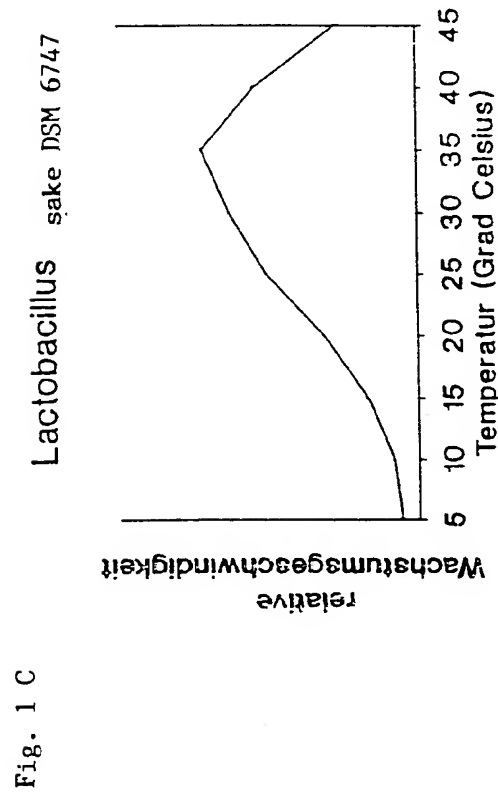
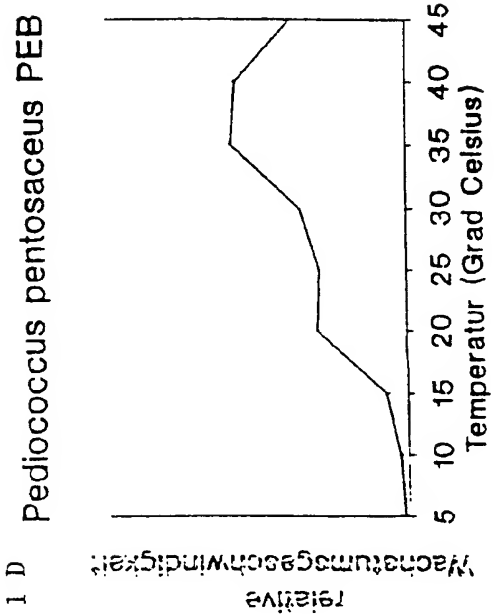
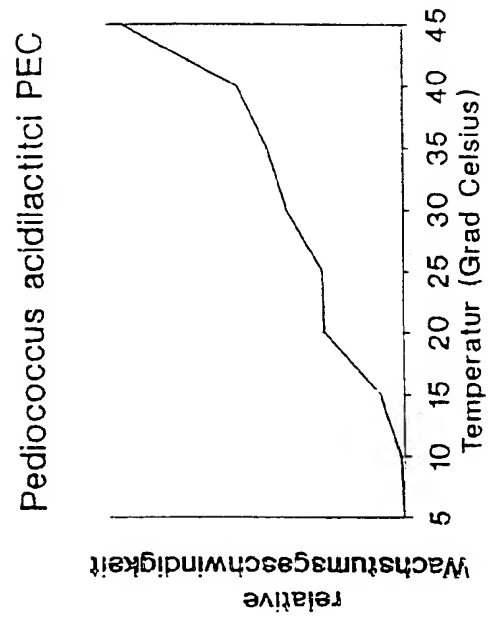


Fig. 1 E



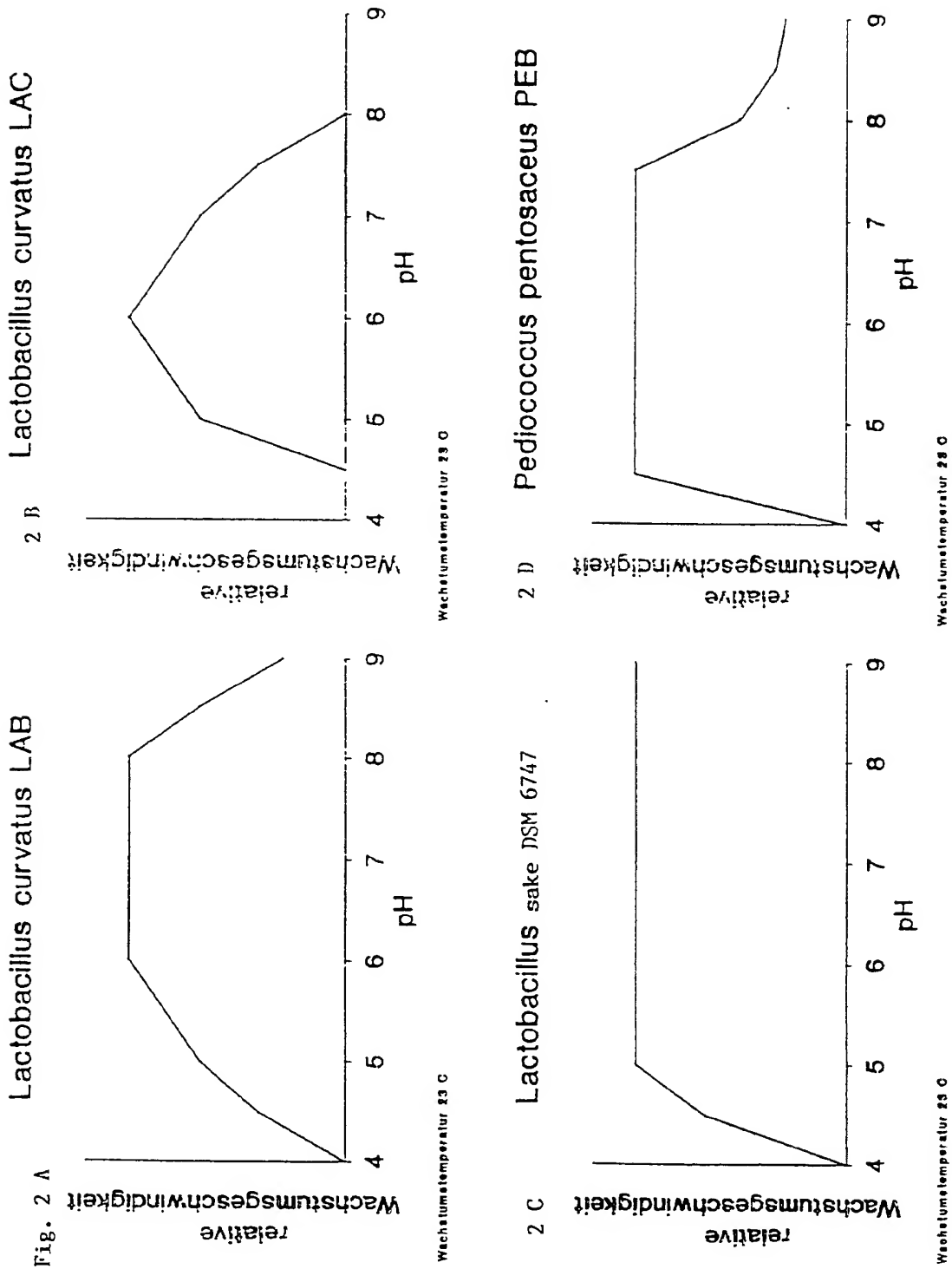
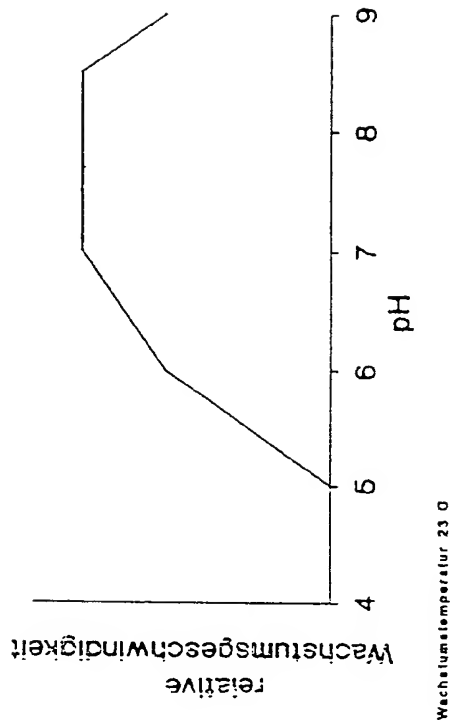
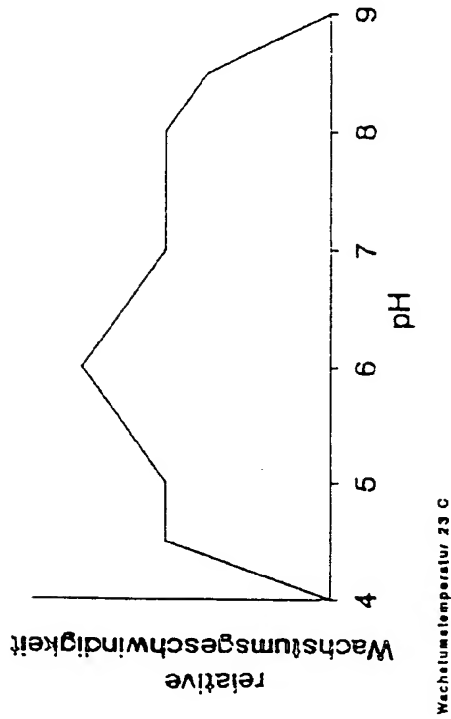


Fig. 2 E

Pediococcus acidilactici PEC

2 F

Micrococcus varians MIB



2 G

Micrococcus varians MIC

2 II

Staphylococcus carnosus SAB

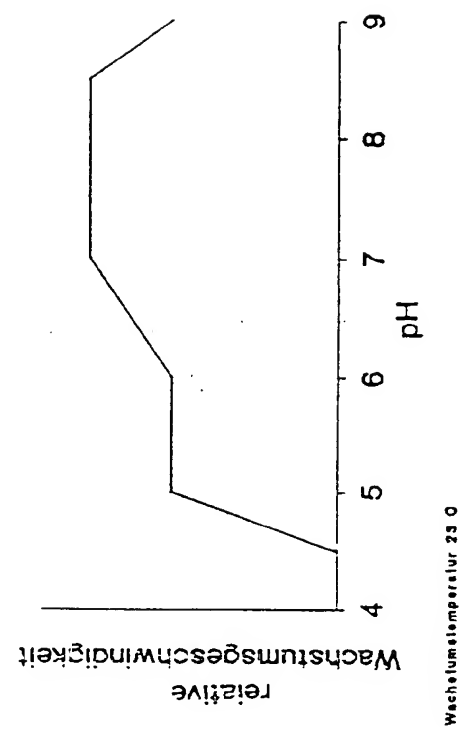
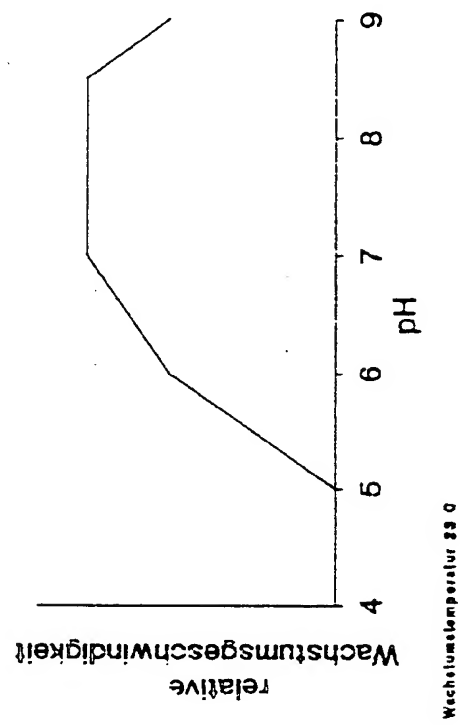
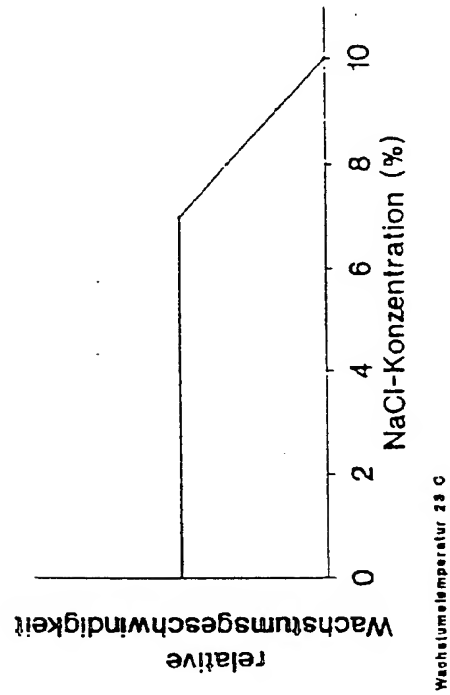


Fig. 3 A

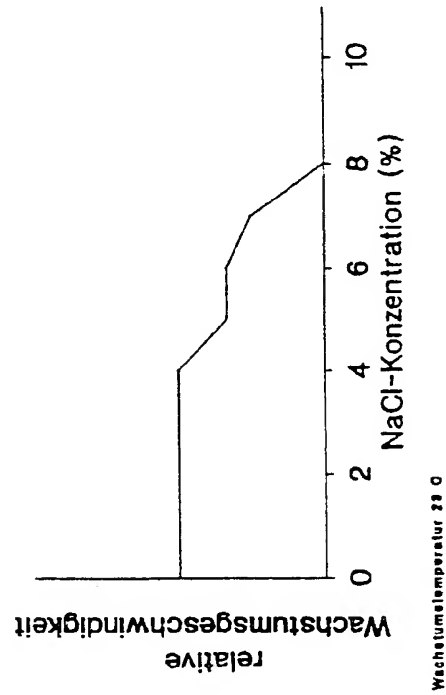
3 B

Pediococcus acidilactici PEC



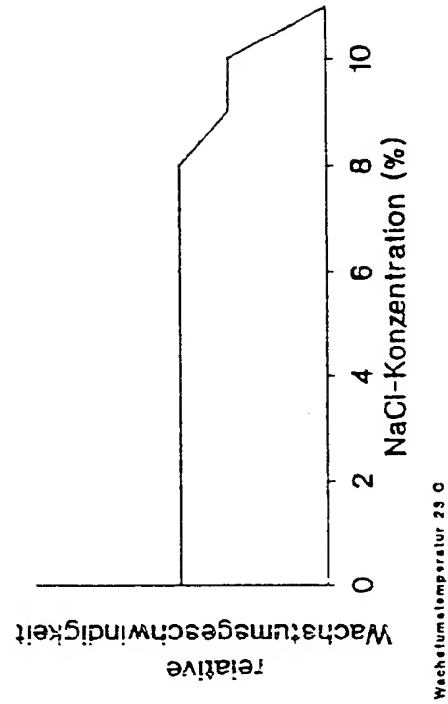
3 C

Micrococcus varians MIC



3 D

Staphylococcus carnosus SAB



3 B

Micrococcus varians MIB

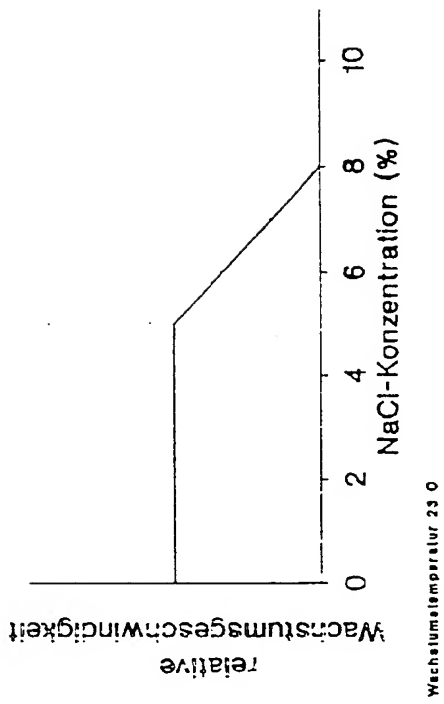
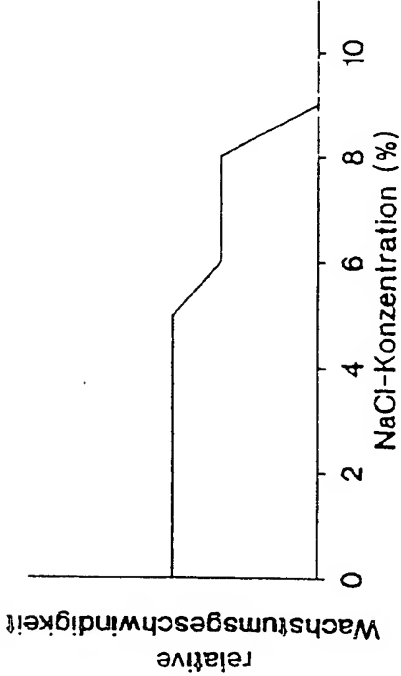


Fig. 3 E

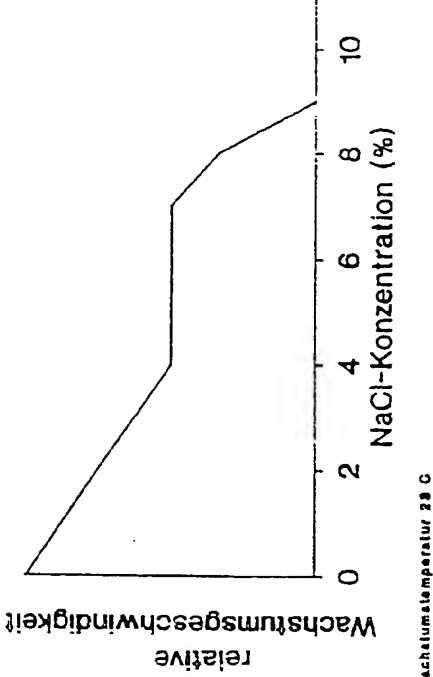
Lactobacillus curvatus LAB



Wachstumstemperatur 23 °C

3 G

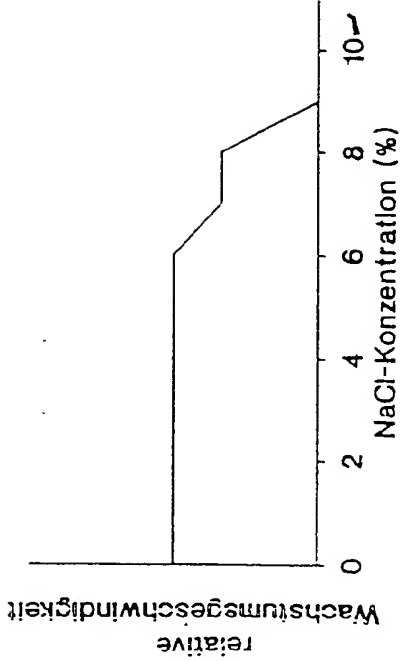
Lactobacillus sake DSM 6747



Wachstumstemperatur 23 °C

3 F

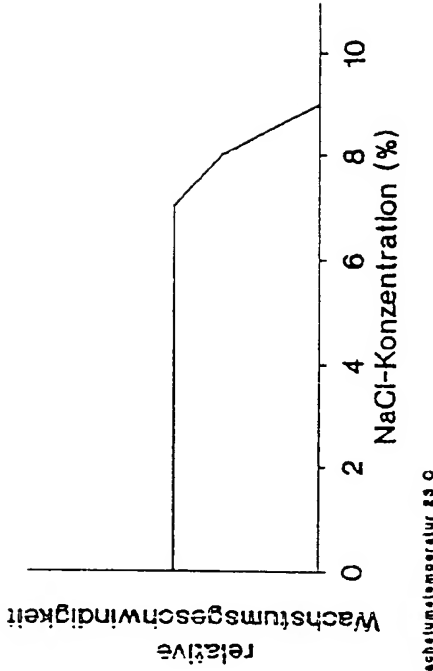
Lactobacillus curvatus LAC



Wachstumstemperatur 23 °C

3 H

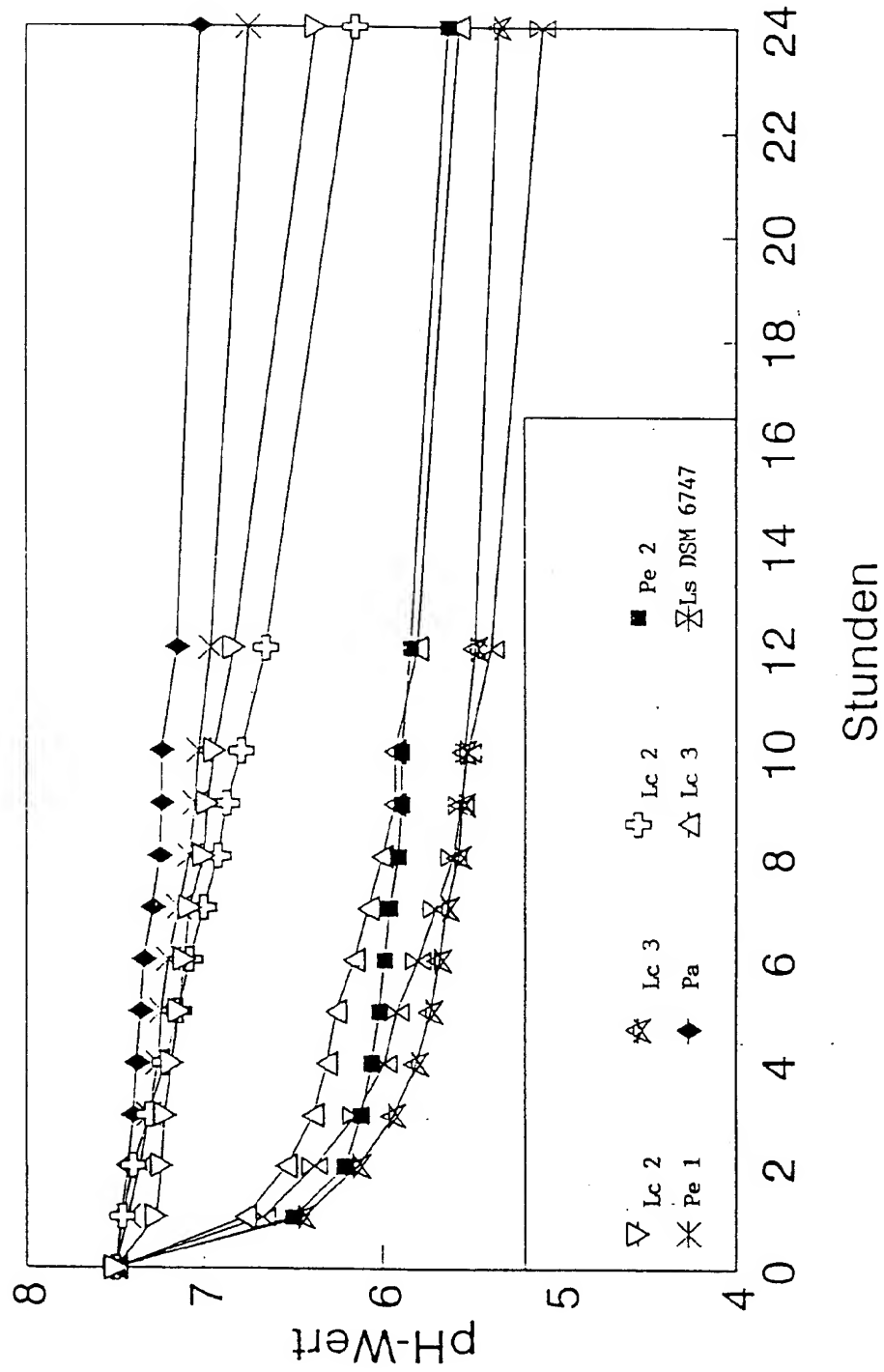
Pediococcus pentosaceus PEB



Wachstumstemperatur 23 °C

Fig. 4

Pe: *Pediococcus pentosaceus*
 Pa: *Pediococcus acidilactici*
 Lc: *Lactobacillus curvatus*
 Ls: *Lactobacillus sake*





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 93 11 1153

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE | | | |
|---|--|---|--|
| Kategorie | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile | Betrifft Anspruch | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5) |
| Y | EP-A-0 321 692 (KARL MÜLLER & CO. KG) * das ganze Dokument * | 1-12 | C12N1/20 A23B4/22 A23L1/314 /(C12N1/20, C12R1:225) |
| D | & DE-A-3 739 989 --- | | |
| Y | DE-A-4 035 836 (LABORATORIUM WIESBY GMBH & CO. KG) * Zusammenfassung; Beispiel 1 * | 1-12 | |
| Y | DATABASE WPI Week 9240, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-327608 & JP-A-4 234 963 (SANEI TOKA KK) 24. August 1992 * Zusammenfassung * | 1-12 | |
| E | DE-C-4 201 050 (KARL MÜLLER U. CO KG) * das ganze Dokument * | 1-12 | |
| | ----- | | |
| | | | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5) |
| | | | C12N A23B A23L C12R |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt | | | |
| Recherchemort BERLIN | | Abschlußdatum der Recherche 20 DEZEMBER 1993 | Prüfer CEDER O. |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE | | | |
| X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur | | T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument | |